ChinaXiv合作期刊

J South Med Univ, 2016, 36(2): 265-268 doi 10.3969/j.issn.1673-4254.2016.02.21

基础研究

大鼠肾脏细胞17β-HSD1的表达及参与性激素合成的能力

张 哲[1],王宏竹[1],刘永惠[1],彭 宇[2],郑清莲[1]
西安交通大学第一附属医院[1]中医科,[2]康复医学科,陕西 西安 710061

摘要:目的 通过研究合成性激素的关键酶17β-HSD1在肾脏中的表达,探讨肾脏是否具备合成性激素的作用。**方法** 基于无促卵泡生成素(FSH)、黄体生成素(LH)培养基和有FSH、LH培养基两种条件下,Western blotting、放射免疫分析法分别检测培养24、48 h后肾脏细胞中17β-HSD1的表达和性激素的分泌情况。**结果** 培养24 h后,大鼠肾脏细胞能够表达少量的17β-HSD1蛋白(0.1843±0.076),同时能够分泌少量的雌二醇、孕酮和睾酮(分别为3.30±3.78 nmol/L,62.60±12.33 pmol/L和22.12±3.36 nmol/L),而在FSH和LH的共同刺激下,大鼠肾脏细胞17β-HSD1蛋白的表达量明显升高(1.6651±0.044,$P<0.01$),同时分泌雌二醇、孕酮和睾酮的量也显著增加(分别为8.50±2.64 nmol/L,117.80±9.79 pmol/L和45.04±4.39 nmol/L,均$P<0.05$),培养24 h和48 h上述指标均无明显差异($P>0.05$)。**结论** 大鼠肾脏细胞中有17β-HSD1的表达,并且在FSH和LH的共刺激下能够稳定分泌性激素,提示肾脏组织具备合成性激素的能力,丰富了肾脏的内分泌功能。
关键词:肾脏;17β-HSD1;内分泌

Expression of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in the kidney of rats: the capacity of the kidney for synthesizing sex hormones

ZHANG Zhe[1], WANG Hongzhu[1], LIU Yonghui[1], PENG Yu[2], ZHENG Qinglian[1]
[1]Department of Traditional Chinese Medicine, [2]Department of Rehabilitation Medicine, First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

Abstract: Objective To investigate the expression of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17β-HSD1) in the kidney of rats and explore the capacity of the kidney for synthesizing sex hormones. **Methods** The expressions of 17-HSD1 and sex hormones were detected by Western blotting and radioimmunoassay in rat renal cells in primary cultured for 24 and 48 h in the presence or absence of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH). **Results** After cell culture for 24 h, the primary rat renal cells expressed a low level of 17β-HSD1 (0.1843±0.076), which increased to 1.6651±0.044 ($P<0.01$) in response to co-stimulation by FSH and LH. Low levels of estradiol, progesterone and testosterone were also detected in rat renal cells (3.30±3.78, 62.60±12.33, and 22.12±3.36, respectively), and co-stimulation of FSH and LH significantly increased their levels to 8.50±2.64, 117.80±9.79, and 45.04±4.39, respectively ($P<0.05$). The levels of these hormones showed no significant differences between cells cultured for 24 h and 48 h ($P>0.05$). **Conclusion** The rat renal cells express 17β-HSD1 and are capable of stably secreting sex hormones in response to co-stimulation with FSH and LH, suggesting the capacity of the rat kidneys for synthesizing sex hormones. These findings enrich the understanding of the endocrine function of the kidney.
Key words: kidneys; 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1; sex hormones; endocrine

17β-羟化类固醇脱氢酶1(17β-HSD1)是最先被克隆和阐述其结构特征的17β-HSDs家族成员之一[1-2],其主要作用是催化还原雌酮转变为活性更高的雌二醇。17β-HSD1在人体内分布广泛[3-4],如胎盘、卵巢、子宫内膜、前列腺、肝脏、皮肤和脂肪等组织内都有活性的17β-HSD1蛋白。17β-HSD1在上述组织中的分布与该酶催化雌二醇合成的作用相一致。

有国外学者[5-12]在大鼠肾脏皮质和髓质内检测到了孕烯醇酮、雄烯二酮和睾酮的分泌,并报道大鼠肾脏组织能够表达参与和调节类固醇激素合成的部分酶类及调节因子,上述报道提示大鼠肾脏组织可能具备合成和分泌性激素的能力。17β-羟类固醇脱氢酶1(17β-HSD1)也是性激素合成的关键酶之一,其是否在大鼠肾脏组织中表达并参与合成性激素尚未有研究报道,因此本实验旨在通过研究其在大鼠肾脏中的表达及其在FSH、LH共刺激下发生的变化来进一步阐述肾脏分泌或合成性激素的途径,丰富肾脏的内分泌功能,为后续研究人类肾脏的生殖内分泌功能提供前期实验基础。

收稿日期:201510-02
基金项目:陕西中医管理局基金(2007-84)
作者简介:张 哲,硕士,主治医师,E-mail: 531043394@qq.com
通信作者:郑清莲,硕士,主任医师,E-mail: doctor198@sohu.com

1 材料和方法

1.1 材料

清洁级SD雌性成年大鼠10只,体质量为200~220 g,

chinaXiv:201712.02092v1

ChinaXiv合作期刊

chinaXiv:201712.02092v1

未交配[西安交通大学医学院动物中心提供合格证号：SCXK(陕)2012-002]。兔抗17β-HSD1多克隆抗体(美国SANTA CRUZ公司)；放免试剂盒(天津九鼎生物制品公司)；总蛋白提取试剂盒(上海贝博生物公司)；卵泡刺激素、黄体生成素(德国Merck公司)；Quantity one凝胶分析系统(美国Bio-Rad公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞处理和培养 取出大鼠肾脏组织，0.25%胰蛋白酶消化后，移入细胞培养瓶，进行细胞培养、换液、接种及计数，后将500 000/瓶的细胞接种到4组孔板内，分为A、B、C、D 4组。具体如下：A组继续原培养基培养，24 h后镜下观察；B组6孔板继续原培养基培养，48 h后镜下观察；C组用含有FSH 40 U/mL和LH 40 U/mL的培养基培养，24 h后镜下观察；D组用含有FSH 40 U/mL和LH 40 U/mL的培养基培养，48 h后镜下观察。最后拍照。

1.2.2 Western Blotting实验 分别提取各组细胞总蛋白样品，SDS-PAGE电泳，转膜，封闭，加入17β-HSD1多克隆抗体(1∶100)，洗膜，加二抗，洗膜，化学发光，曝光，显影，定影，凝胶图象分析，对胶片进行拍照，使用凝胶图象处理系统分析目标带的相对分子质量。

1.2.3 放射免疫分析实验 放射免疫分析法分别测定各组细胞上清液中E_2(雌二醇)、P(孕酮)和T(睾酮)的激素水平。细胞上清液加入相应抗体并混匀，恒温水浴锅水浴1 h，后加入分离剂并混匀，于4 ℃下放置10 min。在FM-2000r免疫计数器上，测定放射性计数，并计算出细胞上清液中P、E_2和T的激素含量，记录数值。

1.3 统计学分析

实验数据用统计软件SPSS 16.0统计软件包进行处理，样品测量结果的数据用均数±标准差表示。两组间比较采用t检验的比较方法，三组及以上之间的比较采用方差分析的比较方法。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞培养结果

2.1.1 无FSH、LH的培养基中肾脏细胞的变化 肾脏细胞在无FSH和LH的培养基中培养时，可以看到细胞呈梭形，胞膜完整，形态规则，贴壁能力较强，生长状态良好。随着培养时间的延长，细胞的密集度增加(图1)。

2.1.2 含有FSH、LH的培养基中肾脏细胞的变化 肾脏细胞在有FSH和LH的培养基中培养时，可以观察到，细胞呈梭形，胞膜完整，形态规则，贴壁能力较强，随着培养时间的延长，细胞的密集度增加。细胞的生长状态没有受到FSH和LH的影响(图2)。

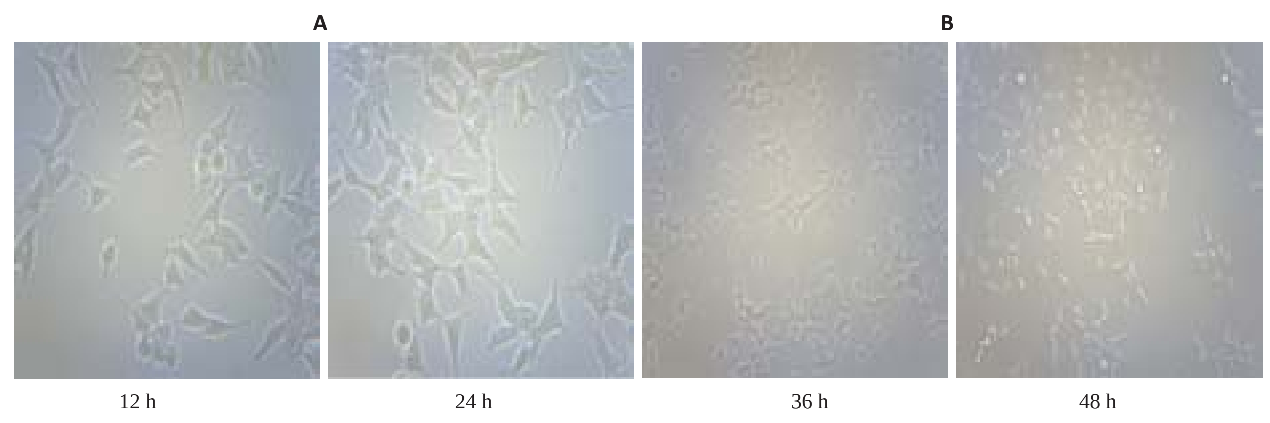


图1 无FSH和LH的培养基中肾脏细胞随时间的变化

Fig.1 Changes of the rat renal cells over time in FSH- and LH-free culture (Inverted microscope, 10×20). *A*: Group A; *B*: Group B.

2.2 Western blotting实验结果

4组肾脏细胞内均可检测到17β-HSD1蛋白的表达(表1、图3)：A组和B组细胞均表达了少量的17β-HSD1，两组表达量无明显差异($P>0.05$)；C组和D组细胞17β-HSD1的表达均显著升高，两组之间无明显差异($P>0.05$)；C组和D组细胞17β-HSD1表达量均明显高于A组和B组(均$P<0.01$，A组*vs* C组，B组*vs* D组)。

2.3 放射免疫分析实验结果

4组细胞的上清液内均检测到P、E_2和T的分泌(表2、图4)；A组和B组细胞分泌少量的P、E_2和T，两组表达量无明显差异($P>0.05$)；C组和D组细胞分泌的P、E_2和T均明显升高，两组之间无明显差异($P>0.05$)；C组和D组细胞分泌的P、E_2和T的量均明显高于A组和B组(均$P<0.05$，A组*vs* C组，B组*vs* D组)。

3 讨论

近年来，有国外学者在研究肾脏内分泌功能时，发现肾脏可能具有分泌或合成性激素的功能[13-14]，Melina等[15]在正常大鼠肾脏的皮质和髓质内检测到了孕烯醇酮、雄烯二酮和睾酮的分泌，且皮质孕烯醇酮的分泌量要高于髓质，但他们并未进一步阐释肾脏是如何分泌或合成性激素的。

ChinaXiv合作期刊

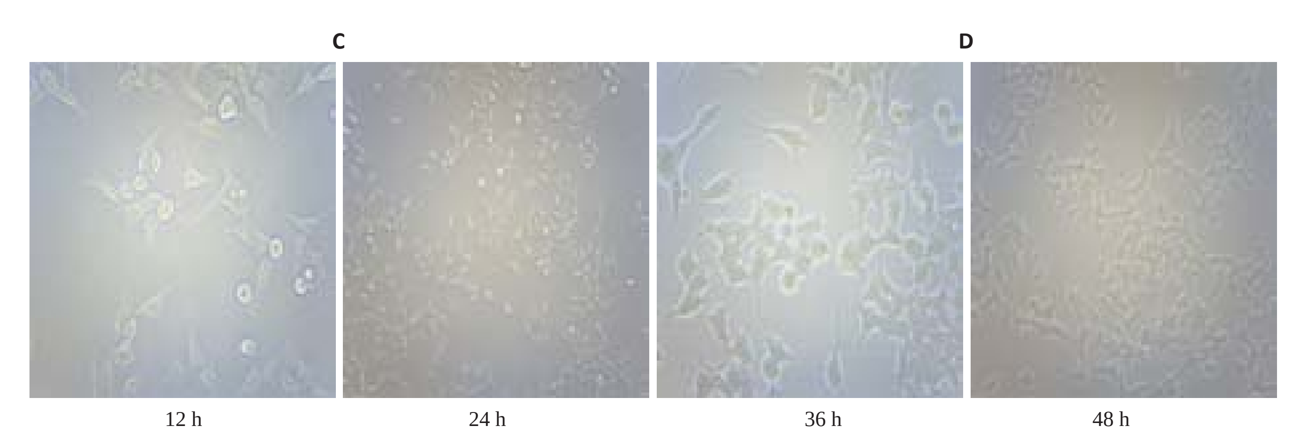


图2 含有FSH和LH的培养基中肾脏细胞随时间的变化

Fig.2 Changes of rat renal cells over time in medium containing FSH and LH (Inverted microscope, 10×20). *C*: Group C; *D*: Group D.

表1 各组细胞内17β-HSD1相对光密度值

Tab.1 Relative expression of 17β-HSD1 in 4 groups of cells (*Mean*±*SD*)

Group	17β-HSD1
A	0.1843±0.076
B	0.1812±0.069△
C	1.6651±0.044▲
D	1.5987±0.045■

Compared to A, △P>0.05, ▲P<0.01, ■P<0.01; Compared to B, ▲P<0.01, ■P<0.01; Compared to C, ■P>0.05.

表2 各组细胞上清液中性激素水平变化

Tab.2 Sex hormone levels in rat renal cells in the 4 groups (*Mean*±*SD*)

Group	*n*	P (pmol/L)	E_2 (nmol/L)	T (nmol/L)
A	6	62.60±12.33	3.30±3.78	22.12±3.36
B	6	58.90±14.74△	2.90±4.51△	25.70±2.93△
C	6	117.80±9.79▲	8.50±2.64▲	45.04±4.39▲
D	6	108.40±8.76■	7.80±3.58■	47.74±4.61■

Compared to A, △P>0.05, ▲P<0.05, ■P<0.05; Compared to B, ▲P<0.05, ■P<0.05; Compared to C, ■P>0.05.

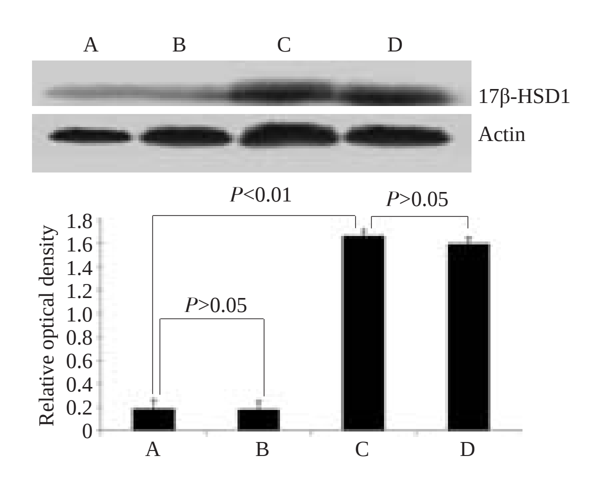


图3 17β-HSD1在各组肾脏细胞内的表达

Fig.3 Expression of 17β-HSD1 in rat renal cell in the 4 groups. A: Group A; B: Group B; C: Group C; D: Group D.

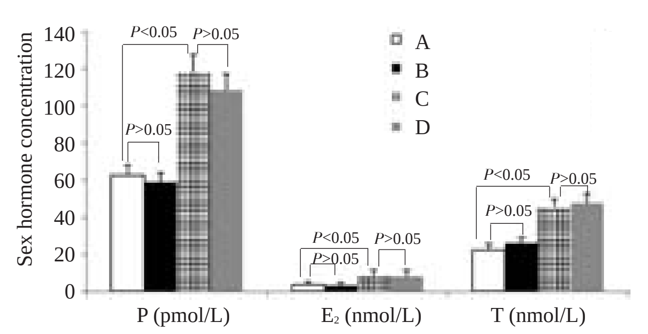


图4 各组细胞上清液中性激素水平量

Fig.4 Levels of sex hormone secretion in the cell cultures in the 4 groups.

有实验证实[5-12]，大鼠肾脏组织能够表达参与和调节类固醇激素合成的部分酶类及调节因子，而且本课题组[16-18]已在前期的实验中证实了大鼠肾脏组织中存在FSHR和LHR的表达，二者信使RNA的表达量与其在卵巢组织中的表达量相当，以上发现都说明大鼠的肾脏组织能够表达性激素合成所需的多种关键物质，但17β-HSDs是性激素合成过程最后一步所需的关键酶，目前尚未有研究报道其在肾脏组织是否表达。

17β-HSD1存在于细胞质内，以可活化的二聚体的形式存在，最适的底物为雌酮，主要作用是催化还原雌酮转变成为活性更高的雌二醇，也有将雄烯二酮转化为睾酮的次要作用，这使它成为合成雌二醇的最终物质[19-20]。FSHR、LHR分别与FSH、LH结合后，能激活细胞膜上的腺苷酸环化酶，使三磷酸腺苷转化成为二磷酸腺苷，增加cAMP的生成，并释放cAMP到细胞质中，进而激活PKA。cAMP和PKA信号的产生能诱导17β-羟化类固醇脱氢酶基因的表达，最终导致性激素合成酶的表达量增加，性激素的分泌量随之而增加。此次实验结

chinaXiv:201712.02092v1

ChinaXiv合作期刊

果首次发现大鼠肾脏细胞能够表达少量的17β-HSD1蛋白,同时能够分泌少量的雌二醇、孕酮和睾酮,而在FSH和LH的共同刺激下,大鼠肾脏细胞17β-HSD1蛋白的表达量明显升高,同时分泌性激素的量也显著增加。由此,结合课题组前期的实验结果,提示肾脏具备合成性激素的能力,其与生殖器官合成性激素所需的关键物质及调控方式是一致的。

课题组和国外的研究证实大鼠肾脏组织中有性激素的分泌以及存在FSHR、LHR、P450scc、P450arom、P450c17、StAR、3β-HSD和17β-HSDs等合成性激素的关键物质,这些均提示肾脏组织具备分泌和合成性激素的能力,通过课题组的系列研究有望增添人类肾脏新的内分泌功能,打破以往对于传统性激素合成器官的认识,为西医临床治疗性激素下降的疾病提供新的思路和方法。肾脏具备合成性激素的功能将会引起国内外同行的重视。

chinaXiv:201712.02092v1

参考文献:

[1] Mansour MF, Pelletier M, Boulet MM, et al. Oxidative activity of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase on testosterone in male abdominal adipose tissues and cellular localization of 17 beta-HSD type 2[J]. Mol Cell Endocrinol, 2015, 414(C): 168-76.

[2] 张万飞, 叶建新. 人类17β-羟基类固醇脱氢酶的功能[J]. 海南医学, 2008, 1(1): 127-30.

[3] 苏 文, 许华敏, 康继宏, 等. 17β-羟基类固醇脱氢酶的功能[J]. 生理科学进展, 2014, 45(1): 27-31.

[4] Bulun SE, Zeitoun KM, Takayama K, et al. Estrogen biosynthesis in endometriosis: molecular basis and clinical relevance[J]. J Mol Endocrinol, 2000, 25(1): 35-42.

[5] Klein AP, Sattely ES. Two cytochromes P450 catalyze S-heterocyclizations in cabbage phytoalexin biosynthesis[J]. Nat Chem Biol, 2015, 11(11): 837-9.

[6] Shamsi S, Chen Y, Lim LY. Characterization and biological properties of NanoCUR formulation and its effect on major human cytochrome P450 enzymes[J]. Int J Pharm, 2015, 495(1): 194-203.

[7] Quinkler M, Bumke-Vogt C, Meyer B, et al. The human kidney is a progesterone-metabolizing and androgen-producing organ[J]. J Clini Endocri Metabo, 2003, 88(6): 2803-9.

[8] Nakamoto M, Fukasawa M, Tanaka SA, et al. Expression of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (hsd3b), star and ad4bp/sf-1 during gonadal development in medaka (Oryzias latipes)[J]. Gen Comp Endocrinol, 2012, 176(2): 222-30.

[9] Basinska-Ziobron A, Daniel WA, Wojcikowski J. Inhibition of human cytochrome P450 isoenzymes by a phenothiazine neuroleptic levomepromazine: An *in vitro* study[J]. Pharmacol Rep, 2015, 67(6): 1178-82.

[10] 田黎明, 谢红付, 杨 婷, 等. CYP17基因多态性与湖南汉族女性青春期后痤疮的相关性研究[J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(7): 1590-2, 1596.

[11] Patel LV, Mckay IE, Burrin JC. Inhibitory effects of curcuminoids on 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity in animal livers[J]. J Experi Biomed Sci, 2013, 19(2): 147-52.

[12] 李明堂, 田来明, 王呈玉, 等. 睾丸酮丛毛单胞菌PhaR基因敲除菌株的构建及其3,17β-HSD对甾族化合物的响应特性[J]. 环境科学学报, 2014, 34(11): 2773-8.

[13] Anjali P, Qin X, Michaele B, et al. Expression of aromatase, androgen and estrogen receptors in peripheral target tissues in diabetes[J]. Steroids, 2010, 5: 779-87.

[14] Pagotto MA, Roldan ML, Pagotto RM, et al. Localization and functional activity of cytochrome P450 side chain cleavage enzyme (CYP11A1) in the adult rat kidney[J]. Mol Cell Endocrinol, 2011, 332(1/2): 253-60.

[15] Patel MV, Mckay IA, Burrin JM. Transcriptional regulators of steroidogenesis, DAX-1and SF-1, are expressed in human skin[J]. J Invest Dermatol, 2011, 117(6): 1559-65.

[16] 张 哲, 郑清莲. FSHR、LHR在大鼠肾脏组织的表达及相关研究[J]. 中医杂志, 2009, 50: 240-1.

[17] 张 哲, 郑清莲. "肾主生殖"理论探析[J]. 中医杂志, 2009, 50(S1): 30-1.

[18] 张 哲, 郑清莲, 刘永惠. 去卵巢大鼠肾脏组织表达FSHR和LHR[J]. 基础医学与临床, 2012, 32(10): 1179-82.

[19] 王 丹, 李海龙, 毕 颖, 等. 栉孔扇贝17β-hsd4基因的克隆和表达分析[J]. 水产学报, 2013, 37(3): 367-75.

[20] 刘传志, 牛莹莹, 陈元安, 等. 小鼠17β-hsd10的克隆、表达及双抗夹心ELISA方法的建立[J]. 生物工程学报, 2014, 30(11): 1774-80.

(编辑:经 媛)